Clonaggio genico con sistemi cellulari

principi – metodi applicazioni

Frabetti

aa 2014-15

Capacità di replicare - *clonare* - specifici frammenti di DNA e di produrne in grandi quantità.

Metodo generale per poter **studiare e purificare** qualsiasi sequenza di DNA o cDNA

Metodica biotecnologica fondamentale che ha permesso lo sviluppo della **BIOLOGIA MOLECOLARE**

POSSIBILI APPLICAZIONI

- individuare nuovi geni da sequenziare

  biblioteche di *DNA genomico* o genoteche

- stabilire quali geni sono espressi in ogni tipo cellulare

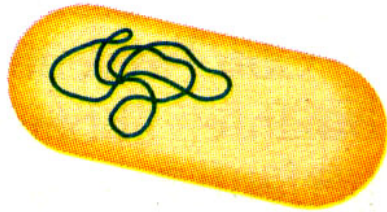
  biblioteche di *cDNA*

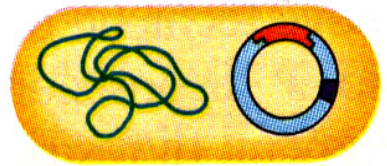
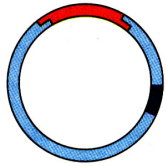
- produzione di molecole ricombinanti

  vettori di espressione (es. insulina umana, ormone della crescita, vaccini come epatite B)

- possibili approcci di terapia genica

COME FUNZIONA il CLONAGGIO del DNA utilizzando cellule?- Premesse concettuali

1) I BATTERI

organismi in grado di replicarsi velocemente ed introitare DNA esogeno

2) I PLASMIDI

frammenti di DNA circolare ectopici al cromonema di molti batteri, **capaci di replicazione autonoma**. Si useranno come **vettori**.

3) GLI ENZIMI DI RESTRIZIONE

endonucleasi che tagliano il DNA in corrispondenza di **specifiche sequenze**

SCELTA DEL VETTORE IN RELAZIONE ALLA CELLULA OSPITE e ALLA GRANDEZZA DEL DNA DA CLONARE

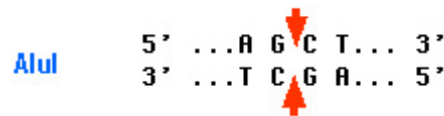
CELLULA OSPITE	VETTORI COMPATIBILI
Escherichia coli	Plasmidi (<10kb), vari fagi (es.M13, P1), BAC, YAC
Lievito	Plasmide 2mm, YAC, Plasmidi navetta
Cellule animali	Vettori derivati da virus (es.SV40)
Cellule vegetali	Plasmidi derivati dal batterio *Agrobacterium tumefaciens*

PREMESSE:

3) GLI ENZIMI DI RESTRIZIONE:

2 tipologie principali

Estremità piatte (*blunt ends*)

```
AluI    5' ...A G↓C T... 3'
        3' ...T C↑G A... 5'

AluI    5' ...A G      C T... 3'
        3' ...T C      G A... 5'
```

Estremità coesive o appiccicose (*sticky ends*)

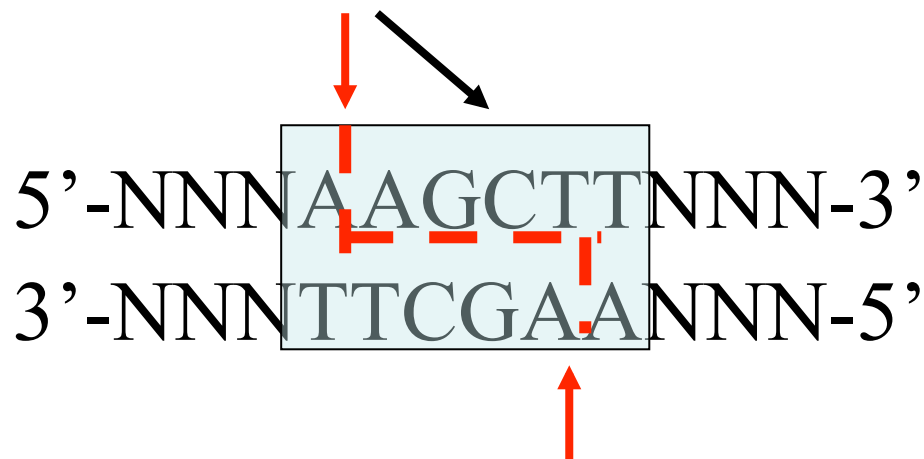
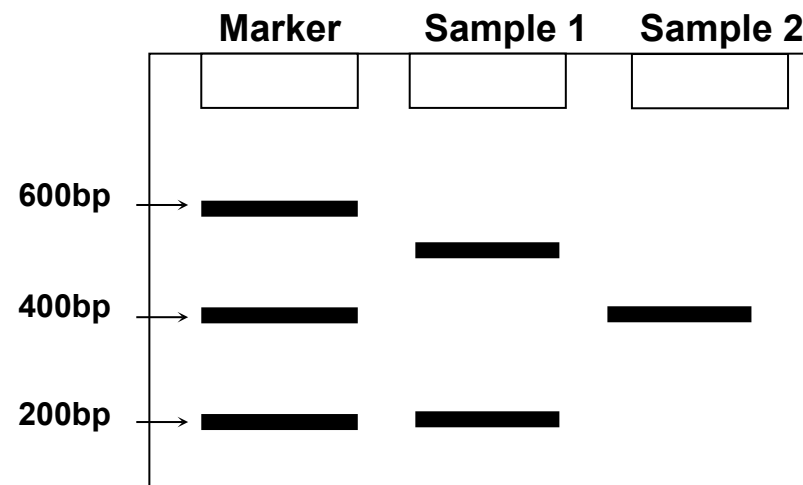
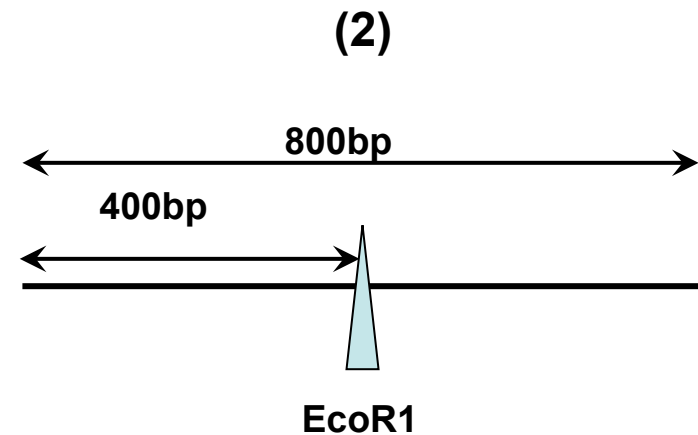
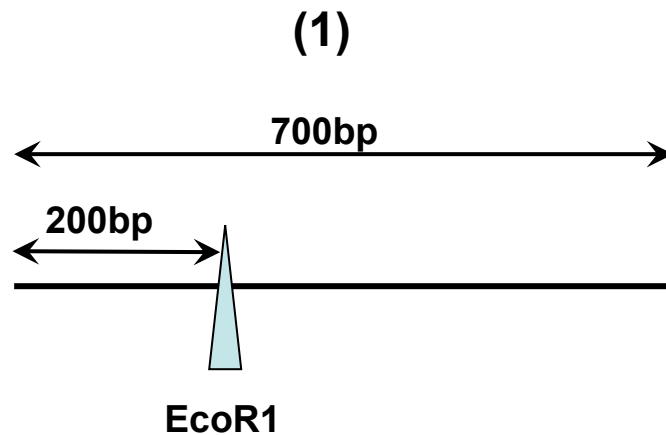
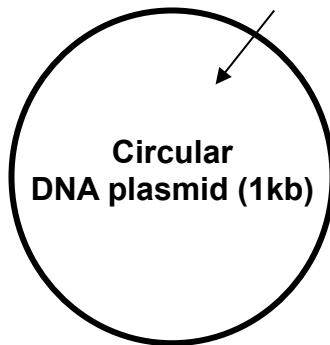
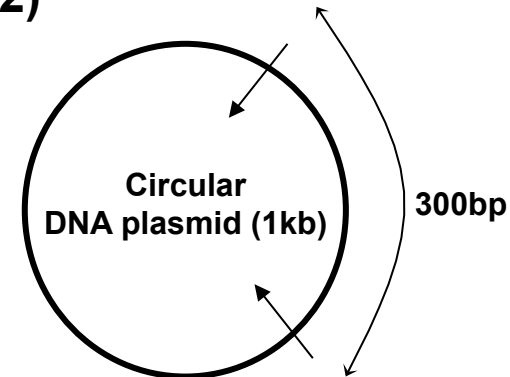
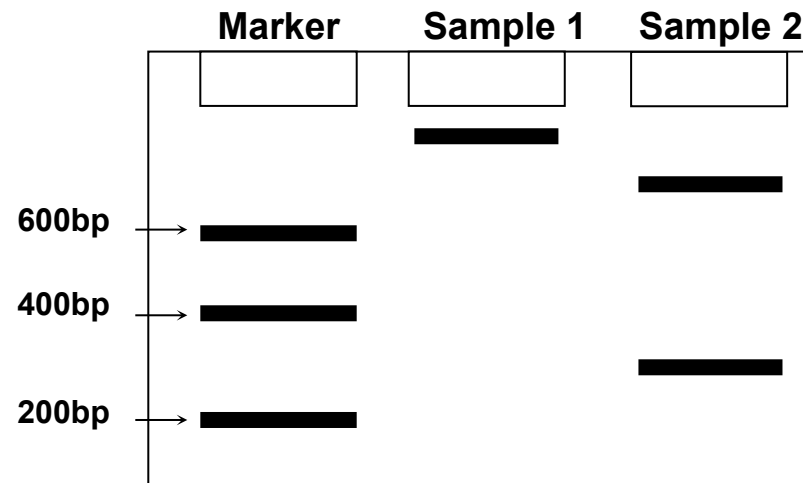
```
EcoRI   5' ...G↓A A T T C... 3'
        3' ...C T T A A↑G... 5'

EcoRI   5' ...G            A A T T C... 3'
        3' ...C T T A A            G... 5'
```

Caratteristiche di alcune endonucleasi di restrizione.

	Nome dell'enzima	Organismo in cui è stato trovato	Sequenze di riconoscimento e posizione del taglio *	Numero di siti di taglio in DNA da λ	pBR322
Enzimi con sequenze di riconoscimento di 6 bp	*BamHI*	*Bacillus amyloliquefaciens H*	5' G↓G A T C C 3' 3' C C T A G↑G 5'	5	1
	BglII	*Bacillus globigi*	A↓G A T C T T C T A G↑A	5	0
	EcoRI	*E. coli RY13*	G↓A A T T C C T T A A↑G	5	1
	HaeII	*Haemophilus aegyptius*	R G C G C↓Y Y↑C G C G R	>30	11
	HindIII	*Haemophilus influenzae R$_d$*	A↓A G C T T T T C G A↑A	6	1
	PstI	*Providencia stuartii*	C T G C A↓G G↑A C G T C	18	1
	SalI	*Streptomyces albus G*	G↓T C G A C C A G C T↑G	2	1
	SmaI	*Serratia marcescens*	C C C↓G G G G G G↑C C C	3	0
Enzimi con sequenze di riconoscimento di 4 bp	*HaeIII*	*Haemophilus aegyptius*	G G↓C C C C↑G G	>50	22
	HhaI	*Haemophilus hemolyticus*	G C G↓C C↑G C G	>50	31
	HpaII	*Haemophilus parainfluenzae*	C↓C G G G G C↑C	>50	26
	Sau3A	*Staphylococcus aureus 3A*	↓G A T C C T A G↑	116	22
Enzimi con sequenze di riconoscimento di 8 bp	*NotI*	*Nocardia otitidis-caviarum*	G C↓G G C C G C C G C C G G↑C G	0	0

Endonucleasi di restrizione

Gli enzimi di restrizione sono come *forbici* molecolari che riconoscono e tagliano specifiche sequenze di DNA (dette *palindromi*)

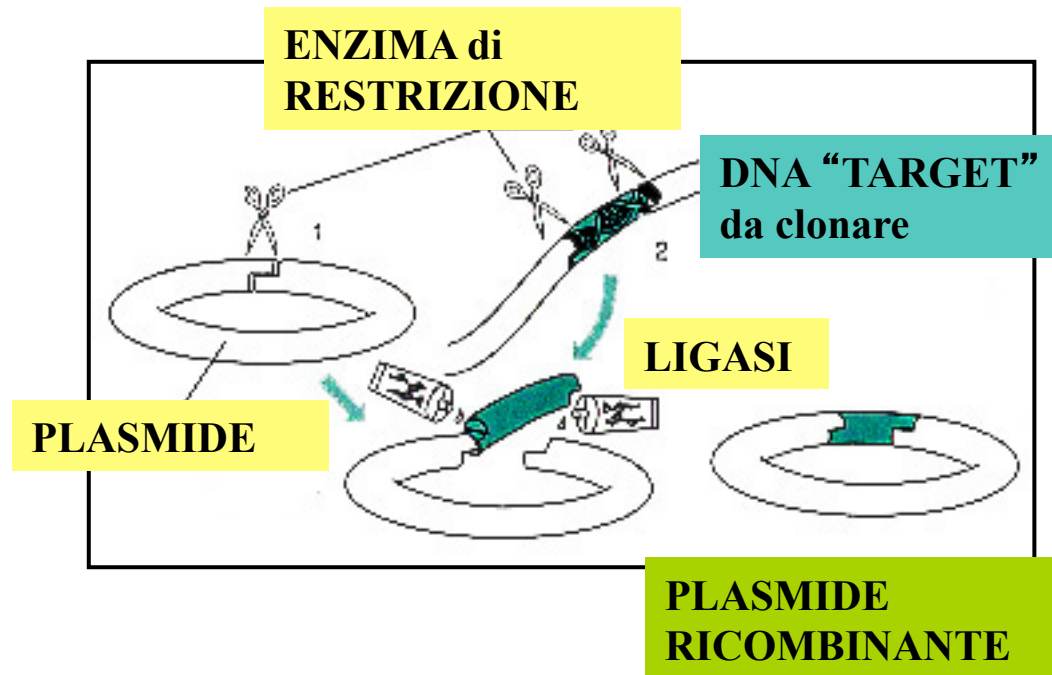
Es. *Hin*d III (*Haemophilus influenza Rd*)

Esempio con *EcoRI*
DIGESTIONE DI 2 CAMPIONI

Esempio
DIGESTIONE DI 2 "VETTORI"

Parziale conclusione

La scelta dell'enzima e della strategia da seguire è importante!

Passaggi essenziali

1. Costruzione delle molecole ricombinanti
2. Trasformazione
3. Propagazione selettiva dei cloni cellulari
4. Isolamento dei cloni contenenti DNA ricombinante

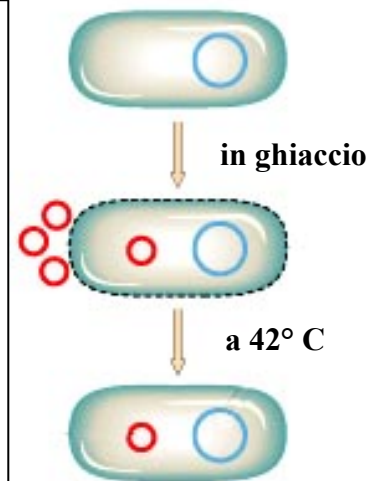
COME FUNZIONA il CLONAGGIO del DNA?

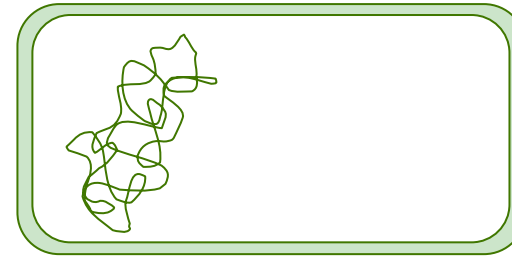
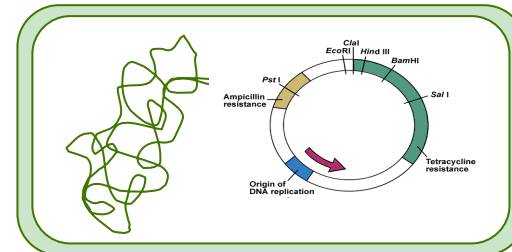
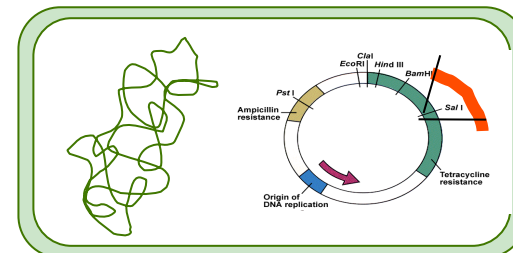
1. Costruzione delle molecole ricombinanti

1. Il DNA da clonare viene tagliato con un **enzima di restrizione**
2. inserito in un **plasmide** tagliato con lo stesso enzima
3. ad opera della LIGASI

2- Trasformazione

4. Il **PLASMIDE RICOMBINATE** viene *inserito* in una cellula batterica e al suo interno si duplica: trasformazione

in ghiaccio

a 42° C

COSA PUO' SUCCEDERE?

1) La cellula <u>non</u> acquisisce il plasmide e quindi neanche il DNA da clonare

2) Il plasmide si richiude su se stesso senza acquisire il DNA da clonare: la cellula acquisisce il plasmide ma <u>NON</u> il DNA da clonare

3) Il plasmide contiene l' inserto in rosso

3- Propagazione selettiva dei cloni cellulari

BISOGNA VERIFICARE che il CLONAGGIO SIA AVVENUTO:

1- Verifica che il plasmide sia entrato:
il plasmide contiene un gene per la resistenza ad un antibiotico;
le cellule vengono fatte crescere in terreno selettivo con antibiotico

Solo le cellule che hanno in effetti il plasmide possono duplicarsi nel terreno contenente l'antibiotico

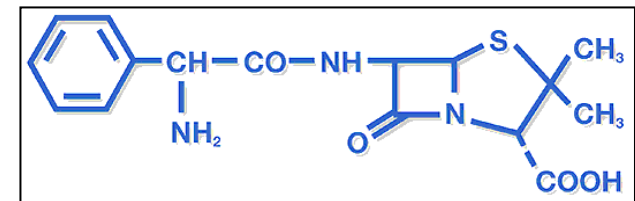
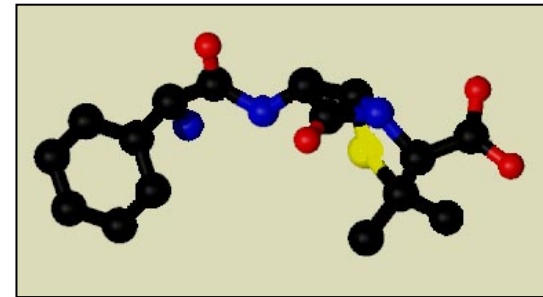
2- Verifca che sia presente l'inserto:
il DNA da clonare viene inserito all'interno di un gene che codifica per un enzima, inattivando la funzione genica e dunque impedendo la sintesi di tale enzima**. *Marker* di selezione per inattivazione genica.**

Esempio: le cellule contenenti il DNA da clonare, presentano una inattivazione dell'enzima (es. β-galattosidasi o *lacZ*)

Preparazione del terreno di coltura SELETTIVO e delle piastre di crescita:

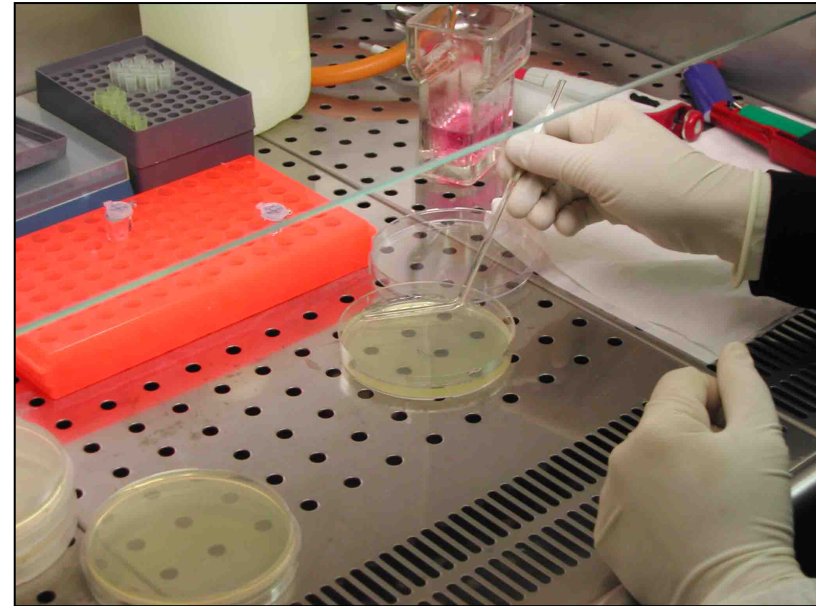
Il terreno contenente agarosio raffreddandosi si solidifica.

Il terreno inoltre contiene sostanze utili alla selezione come gli antibiotici:

CH — CO — NH
NH_2
S
CH_3
CH_3
N
O
COOH

ANTIBIOTICO:

es. AMPICILLINA

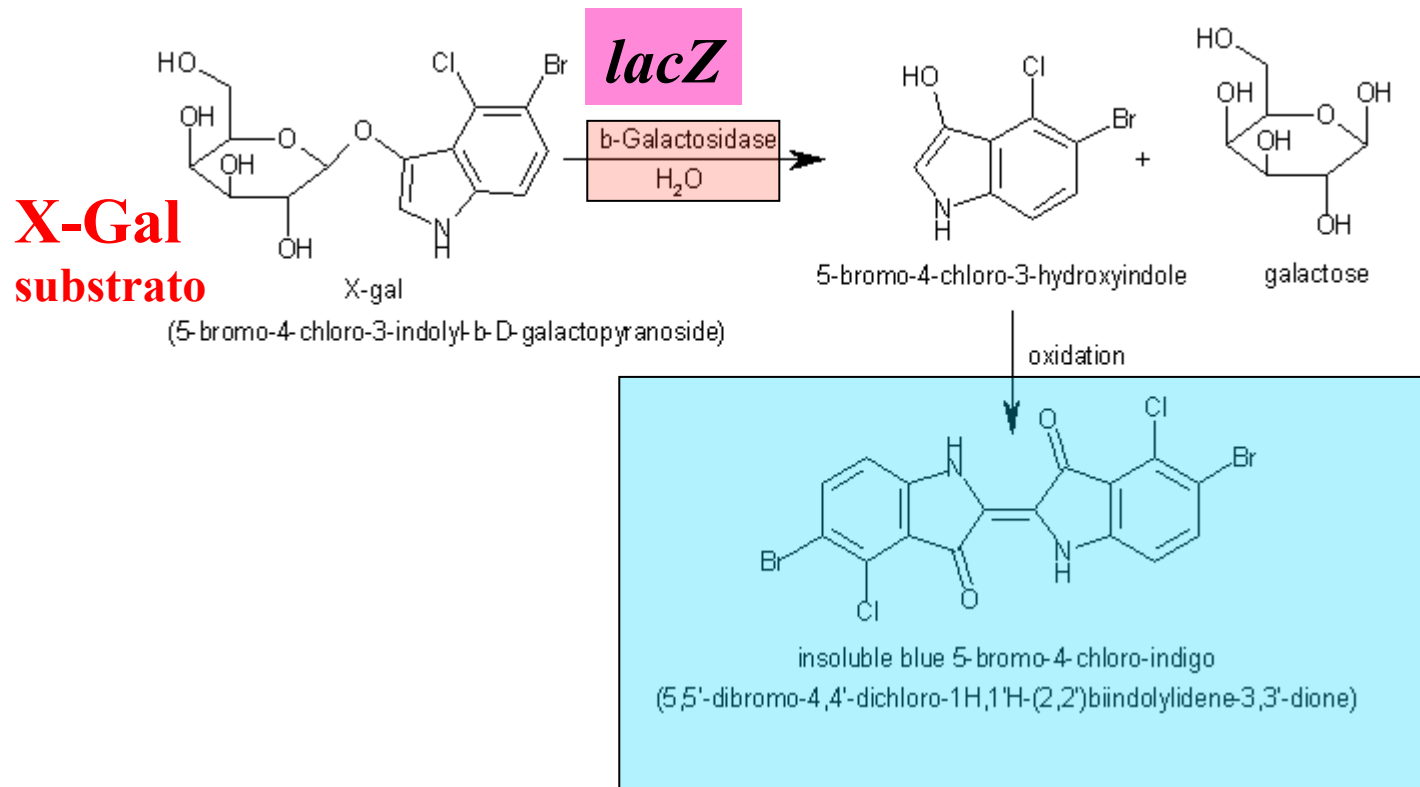
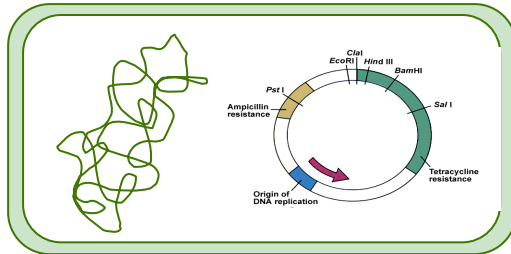
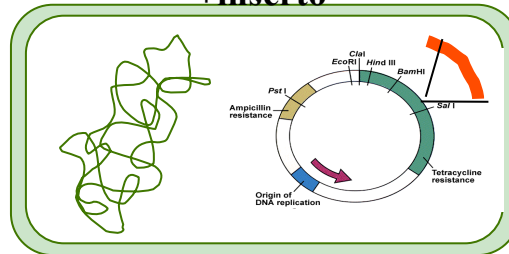
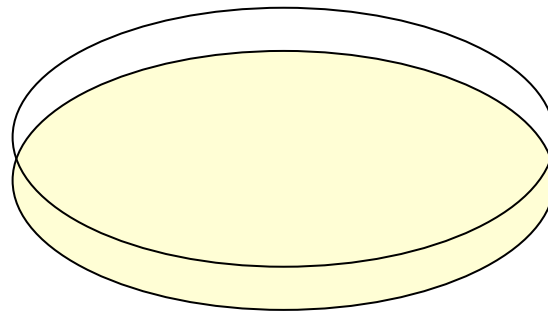
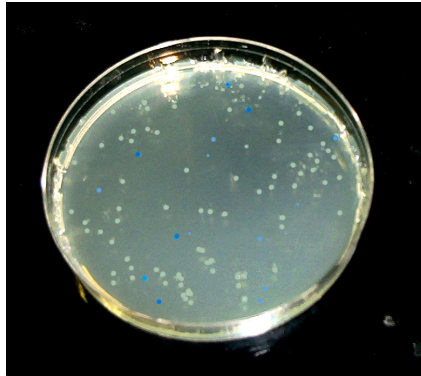
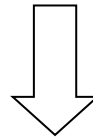
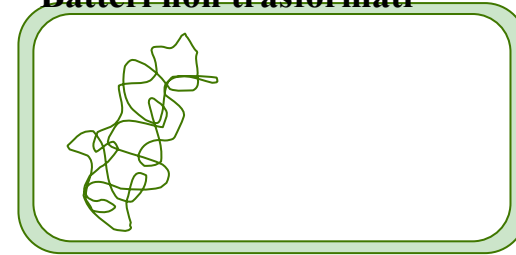
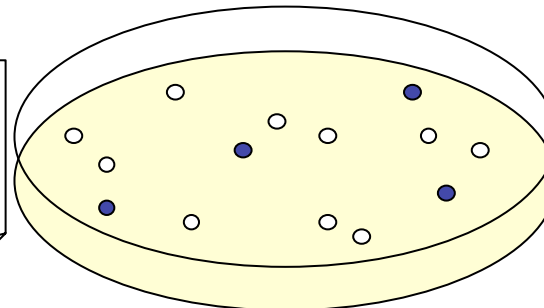
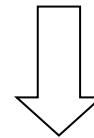
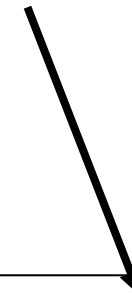
Le cellule TRASFORMATE vengono seminate in una piastra

e fatte crescere in un incubatore

Il terreno oltre all'antibiotico

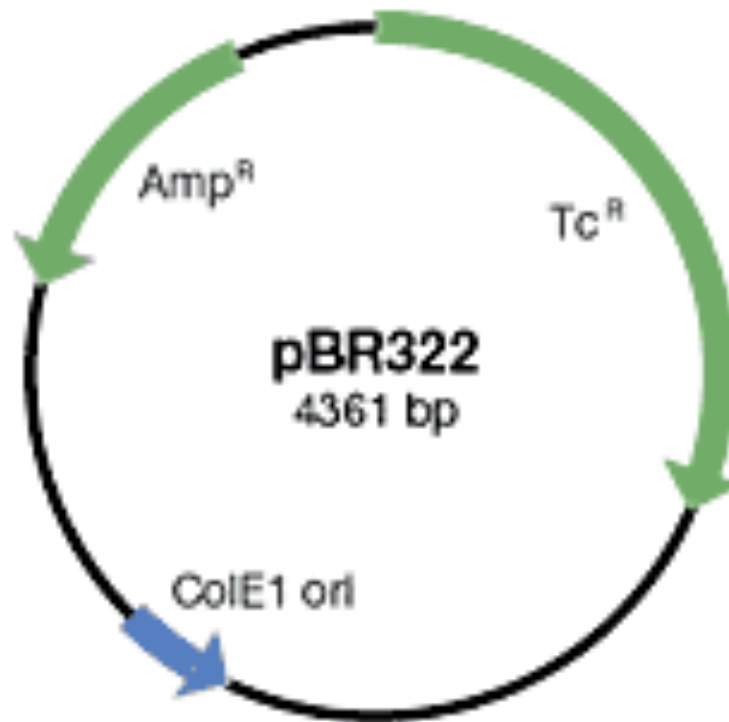
può contenere *X-Gal*

Cosa è X-Gal???

Selezione colonie Blu/bianche

- Basata sulla reazione enzimatica della **β-galactosidasi** (*lacZ*).

Selezione colonie blu/bianche

pBR322

- **CONTIENE**

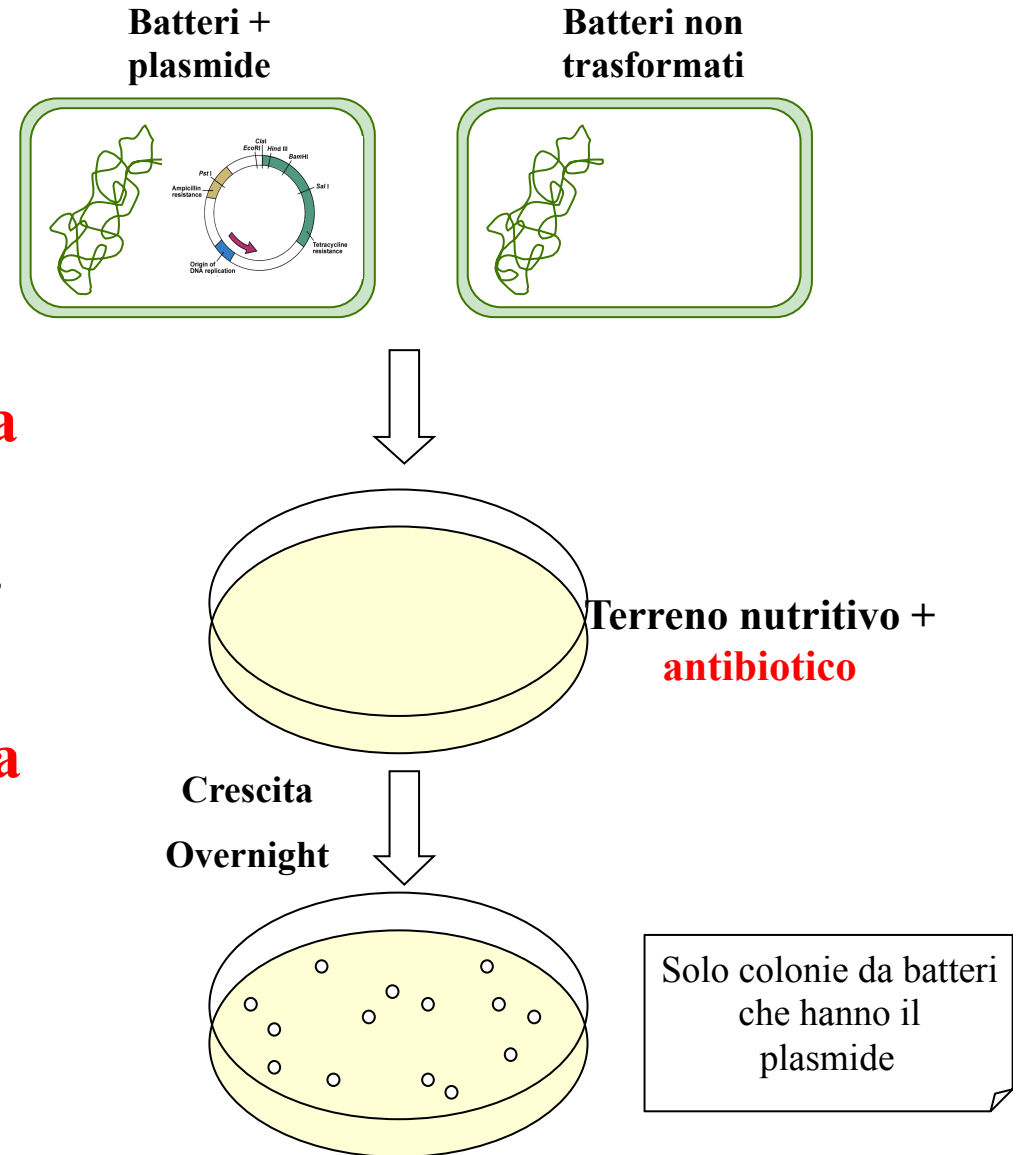
1) Origine di replicazione (*Ori* - colE1)

pBR322

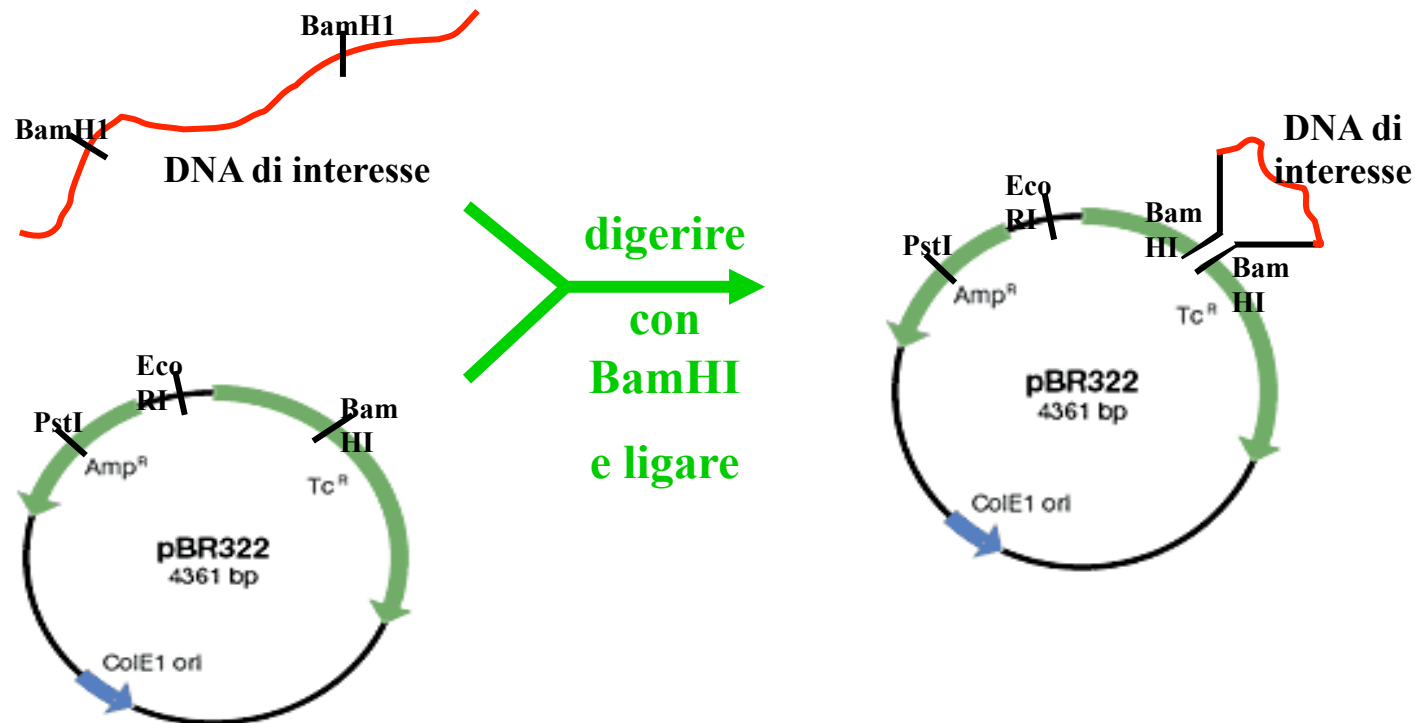
2. *Markers* selezionabili di resistenza agli antibiotici:

- resistenza alla **ampicillina**

  (gene per la ***β-lactamase o penP, superfamiglia delle Transpeptidasi***)

- resistenza alla **tetraciclina**

  (gene ***tet***)

pBR322

3. Alcuni “*buoni*”/utili siti di restrizione per inserire il DNA estraneo

pBR322

- Caratteristiche utili

  200 copie per cellula di *E. coli*

  Fa DNA a doppio filamento

  Tutti i vettori più moderni sono *concepiti* su pBR322

Generazione successiva:
pUC Plasmidi

- Vantaggi aggiuntivi su pBR322
  1. Fa 1000 copie / cellula
  2. Taglia piccola 2.7 (kb) = più facile da introdurre in E.Coli
  3. Sito multiplo di clonaggio (*Multiple cloning site* MCS)
     - **Ampicillina resistenza (Amp_R)**
  4. Selezione più semplice
     - **Selezione colonie blu/bianche (*lacZ*)**

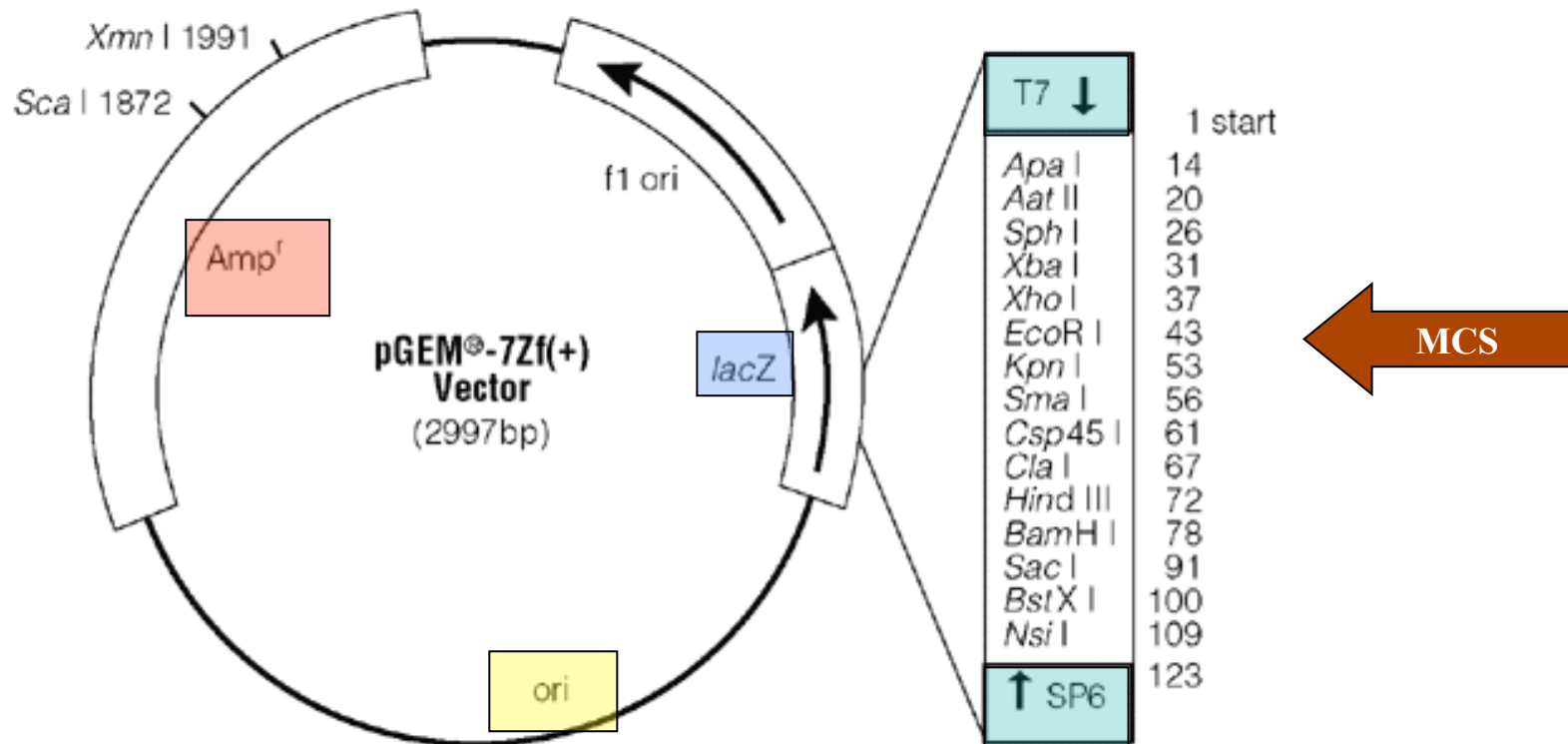
pUC Plasmids

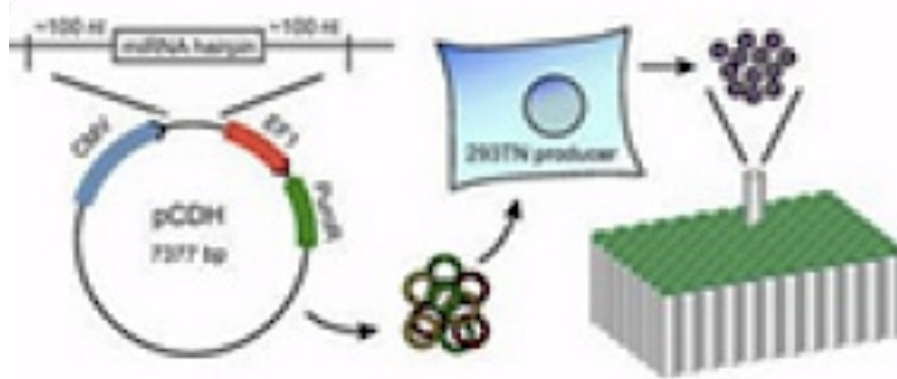
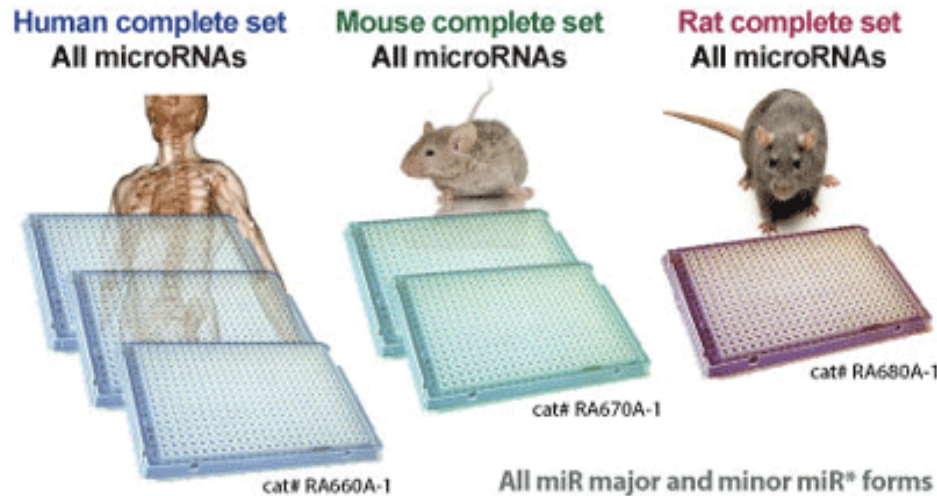
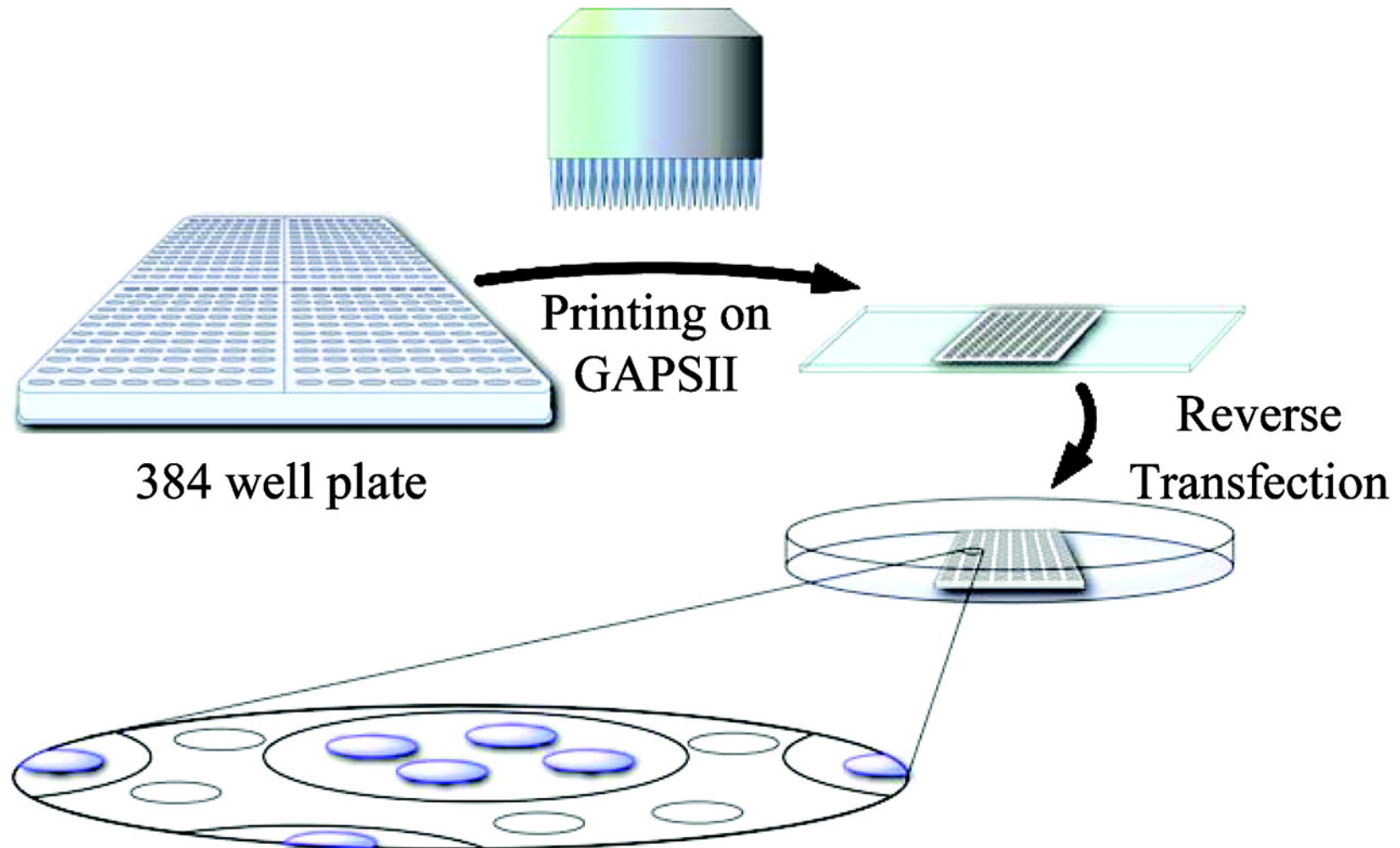
3. **Sito multiplo di clonaggio** (*Multiple cloning site* MCS)

4. Selezione più semplice con selezione delle colonie blu/bianche (*lacZ*): il clonaggio avviene dentro al gene *lacZ*

Clonaggio di espressione

Forma di clonaggio del cDNA in vettori specializzati che consentono l’espressione di un prodotto genico codificato nell’inserto

Ultima generazione
pGEM e pBluescript

Questi plasmidi presentano sequenze promotrici T7 e SP6 utili alla produzione di RNA

CLONAGGIO ed estrazione di ogni singolo clone di espressione piastrato in pozzetto/well

Genoteca completa di miRNA
in cui ogni singolo pozzetto contiene un clone di espressione per uno specifico miRNA

Outline of the protocol used to perform reverse transfection on a glass slide.

Jose M. Silva et al. PNAS 2004;101:6548-6552